

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 673 514**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/50
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2010 PCT/EP2010/068235**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11064308**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2010 E 10787078 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2504698**

(54) Título: **Procedimiento para la predicción de la respuesta de una enfermedad tumoral a una medida terapéutica**

(30) Prioridad:

25.11.2009 DE 102009047146

(73) Titular/es:

**PACHMANN, ULRICH (50.0%)
Brandenburger Strasse 30
95448 Bayreuth, DE y
PACHMANN, KATHARINA (50.0%)**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.06.2018

(72) Inventor/es:

**PACHMANN, ULRICH y
PACHMANN, KATHARINA**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 673 514 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la predicción de la respuesta de una enfermedad tumoral a una medida terapéutica

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la predicción de la respuesta de una enfermedad tumoral originada por un tumor epitelial sólido de un paciente a una medida terapéutica. Por un tumor sólido se entiende un tumor cuyas células crecen en el agregado celular y a este respecto forman un tejido sólido, localmente transrito. Se sabe que se desprenden células de un tumor de este tipo y se distribuyen a través de la sangre o la linfa en el organismo.
- 10 Se sabe además que los tumores son sensibles de manera distinta frente a medidas terapéuticas, tal como por ejemplo una quimioterapia o una radiación. La sensibilidad de las células cancerígenas frente a agentes antineoplásicos que inhiben el crecimiento administrados en el contexto de una quimioterapia, los denominados agentes citoestáticos, se designa como quimiosensibilidad. El éxito de una quimioterapia depende entre otras cosas de la quimiosensibilidad de las células cancerígenas. Por ejemplo puede estar reducida la quimiosensibilidad frente a agentes citoestáticos del grupo de los compuestos alquilantes, que actúan a través de una modificación del material genético de las células tumorales, mediante la activación de enzimas reparadoras de ADN en células tumorales. Igualmente, un transporte reducido de agentes citoestáticos al interior celular, la inactivación de los agentes citoestáticos o también la falta de expresión de receptores que median la acción puede conducir a una reducción de la quimiosensibilidad de las células tumorales. Una quimiosensibilidad reducida de las células tumorales puede provocar una falta de éxito de la terapia.

- 20 Se supone que cada paciente debido a su fondo genético y al desarrollo de subclones dentro de un tumor reacciona de manera individual a un determinado agente antineoplásico. Para determinar para un paciente el agente antineoplásico más eficaz para el mismo, se obtienen actualmente antes del tratamiento del tumor en primer lugar células de trozos de tejido del tumor, digiriéndose el tejido tumoral de los trozos de tejido con enzimas de acción proteolítica. A continuación se determina *in vitro* la quimiosensibilidad de las células obtenidas del tejido tumoral y cultivadas durante un tiempo más largo frente a distintos agentes antineoplásicos. Para ello se somete a prueba si se reproducen las células cultivadas en presencia de un determinado agente antineoplásico o si éstas mueren en su presencia. Mediante el procedimiento debe impedirse en gran parte que se trate un paciente con un agente antineoplásico no eficaz o de mala eficacia para él.

- 30 Por Bird, M. C. *et al.*, Leuk. Res. 1986, 10(4):445-449 se conoce un ensayo de quimiosensibilidad *in-vitro* para tumores hematológicos. A este respecto se aislan leucocitos de sangre o médula ósea, se exponen a un agente terapéutico y se incuban durante 4 días. La destrucción de células tumorales mediante el agente terapéutico se determinó mediante coloración diferenciada de células vivas y muertas, identificándose morfológicamente las células vivas. Es desventajoso en caso de este procedimiento que es adecuado solo para someter a ensayo la quimiosensibilidad de tumores hematológicos.

- 35 Por Pachmann, K. *et al.*, J. Clin. Oncol. 2008, 26:1208-1215 se conoce que el riesgo de recaída de pacientes con cáncer de mama, que reciben una quimioterapia adyuvante, puede predecirse mediante determinación del número de células tumorales epiteliales (CETC) que circulan en sangre durante y al final de la quimioterapia con una cierta probabilidad. Se supone que el aumento de las CETC se basa en metástasis ya crecientes, que expulsan células en la circulación. El control del número de CETC se considera como herramienta valiosa para el control de la terapia.

- 40 45 Por Veneziani, B. M. *et al.*, Mol. Cancer Ther. 2007, 6(12), páginas 3091 a 3099 se conoce extraer tejido de tumores epiteliales sólidos y aislar de éste células estromales y células epiteliales y cultivar estas células en cocultivo durante al menos 15 días. Tras el paso de las células se exponen éstas a distintos agentes terapéuticos y se somete a estudio la inhibición del crecimiento celular de las células tumorales para obtener indicaciones de la eficacia de los agentes terapéuticos. En desventajoso en caso de este procedimiento que su realización dure relativamente mucho tiempo.

- 50 55 60 65 Por el documento US 2007/071762 A1, para la selección de un agente antineoplásico para el tratamiento de cáncer se conoce enriquecer células cancerígenas circulantes de la sangre y determinar la expresión de una serie de indicadores de respuesta a medicamentos usando anticuerpos en al menos una célula de la muestra de células tumorales y seleccionar en base a esta expresión un agente antineoplásico. En el caso de los indicadores de respuesta a medicamentos puede tratarse de componentes celulares que están relacionados con el mecanismo de acción del agente antineoplásico. Por ejemplo puede tratarse a este respecto de la proteína reparadora de ADN ERCC1, beta-tubulina III, timidilato-sintasa, topoisomerasa II, topoisomerasa I o ribonucleasa-reductasa. De acuerdo con el ejemplo 7 se describe un sistema *in vitro*, que describe la respuesta citotóxica de líneas celulares humanas cultivadas a medicamentos anticancerígenos. Para predecir la respuesta de medicamentos anticancerígenos se usan líneas celulares. Las células se siembran para ello y se mantienen durante 24 horas a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %. Después se exponen las células al respectivo medicamento. En el caso de tamoxifeno se cultivan las células durante 72 horas hasta llegar a la confluencia. A continuación se añade medio con FCS al 0,5 % (suero bovino fetal) para maximizar la expresión de receptores de estrógeno. Los controles contienen un medio correspondiente y se tratan de igual manera que las células tratadas. 72 horas tras el tratamiento se determina por

medio de una sal de tetrazolio el número de células vivas para cada concentración de medicamento. Como resultado se obtiene la inhibición porcentual del crecimiento en comparación con la concentración del medicamento.

5 El documento DE 198 33 738 A1 divulga un procedimiento para el aislamiento de células cancerígenas de líquidos corporales, en el que se retienen las células cancerígenas por un tamiz. Las células aisladas pueden cultivarse *in vitro* con adición de agentes citoestáticos, de modo que pueden someterse a ensayo *in vitro* distintas formas de terapia y pueden optimizarse para cada paciente de manera individual.

10 El documento WO 03/065042 A1 se refiere a un procedimiento para la evaluación de la existencia de una malignidad, en el que se lleva a contacto una muestra con una población celular mixta, que contiene células malignas hematopoyéticas y no hematopoyéticas, con un ligando detectable que reacciona de manera específica con las células malignas y al menos un reactivo que marca igualmente de manera específica las células malignas. A continuación se analiza el número de células marcadas para determinar la existencia y el número de células malignas. Además se determinan modificaciones en al menos una molécula asociada a diátesis tumoral. Las células malignas marcadas pueden llevarse a contacto con un agente antineoplásico para determinar su sensibilidad con respecto a esto.

15 Por Bosanquet, A. G. *et al.*, Br. J. Cancer 1983,47, páginas 781 a 789 se conoce la determinación de la químiosensibilidad en células de leucemias linfáticas crónicas, que a diferencia de las células de células tumorales epiteliales aparecen en número relativamente grande en la sangre de pacientes afectados. En el procedimiento se aíslan glóbulos blancos de sangre periférica, se exponen a un medicamento y se cultivan durante 4 días. La destrucción inducida por los medicamentos de células tumorales se determina mediante distintas coloraciones de células muertas y vivas. A continuación se calcula la viabilidad de las células tumorales. De acuerdo con la página 782, columna derecha, cuarto párrafo, el medio RPMI usado para el cultivo de las células contiene suero bovino fetal (FCS).

20 Por Weisenthal, L. M. y Lippman, M. E., Cancer Treatment Reports 69, n.º 6, 1985, páginas 615 a 632 y Weisenthal, L. M. *et al.*, Recent Results en Cancer Research 94, páginas 161 a 173 se conoce obtener de una muestra de tejido de un tumor sólido una población celular y realizar con ello un ensayo de químiosensibilidad. El ensayo puede realizarse como ensayo clonogénico o no clonogénico.

25 El objetivo de la presente invención es indicar un procedimiento alternativo que ha de realizarse rápidamente, que antes de la realización de una medida terapéutica contra una enfermedad tumoral que se basa en un tumor epitelial sólido permita una predicción sobre si el tumor es sensible frente a la medida terapéutica.

30 Este objetivo se soluciona mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1. Ciertas configuraciones convenientes resultan de las características de las reivindicaciones 2 a 11.

35 De acuerdo con la invención es un procedimiento para la predicción de la respuesta de una enfermedad tumoral originada por un tumor epitelial sólido de un paciente a una medida terapéutica, en el que las células tumorales epiteliales de un líquido corporal del paciente se suspenden en cada caso en un medio de cultivo celular. En el caso de las células tumorales epiteliales contenidas en el líquido corporal se trata de células desprendidas del tumor sólido.

40 45 El medio de cultivo celular es un medio que obtiene la viabilidad de las células tumorales en cultivo celular. Se conocen numerosos medios de este tipo, tal como por ejemplo F12 de Ham o RPMI. El medio de cultivo celular no contiene ningún factor de crecimiento añadido o bien ningún suero, tal como por ejemplo suero bovino fetal. Mediante esto se produce una selección de las células tumorales epiteliales frente a otras células contenidas eventualmente, ya que las células tumorales a diferencia de las otras células no requieren factores de crecimiento añadidos desde fuera para la supervivencia o bien la proliferación.

50 55 60 En el procedimiento se exponen las células tumorales de una muestra del medio de cultivo celular que contiene las células tumorales a la medida terapéutica, mientras que las células tumorales de una muestra control del medio de cultivo celular que contiene las células tumorales permanecen no tratadas. A continuación se determina para la muestra y para la muestra control en cada caso la proporción de células tumorales epiteliales destruidas y muertas en el número total de las células tumorales epiteliales y a partir de esto se determina una tasa de mortalidad condicionada por la medida terapéutica de las células tumorales epiteliales como medida de la respuesta. La proporción de células tumorales epiteliales destruidas y muertas puede determinarse también de manera indirecta, determinándose la proporción de células tumorales epiteliales vivas y no destruidas en el número total de células tumorales epiteliales y restándose de la totalidad que corresponde al número total (100 % o 1). La proporción de células tumorales epiteliales destruidas y muertas o bien vivas y no destruidas puede determinarse con ayuda de procedimientos citométricos o de análisis de imagen.

65 La tasa de mortalidad condicionada por la medida terapéutica de las células tumorales epiteliales se determina restándose la proporción de células tumorales epiteliales destruidas y muertas en la muestra control de la proporción de células tumorales epiteliales destruidas y muertas en la muestra. La tasa de mortalidad puede determinarse

dependiendo del tiempo y/o dependiendo de la concentración de un agente antineoplásico o de la intensidad de una medida terapéutica, por ejemplo de una radiación.

5 Una gran ventaja en cuanto a la carga del paciente y en cuanto a una realización rápida del procedimiento consiste en que para la realización del procedimiento no se requiere ningún material que haya de extraerse del tumor epitelial sólido.

10 En el procedimiento de acuerdo con la invención no es necesario además cultivar las células tumorales epiteliales antes de que se expongan a la medida terapéutica. Las células tumorales pueden exponerse directamente tras la suspensión en el medio de cultivo celular a la medida terapéutica.

15 Entre la medida terapéutica y la determinación de la proporción de células tumorales epiteliales destruidas y muertas en el número total de células tumorales epiteliales puede encontrarse un tiempo de una hora hasta algunos días, en particular de 2 horas, 3 horas, 1 día, 2 días o 3 días. En este tiempo se mantienen las células tumorales en condiciones de cultivo celular habituales, que permiten sin medida terapéutica una supervivencia de las células tumorales en el medio de cultivo celular. Habitualmente comprenden tales condiciones de cultivo celular un contenido en CO₂ de la atmósfera del 5 % - 10 % y una temperatura de 37 °C. El medio de cultivo celular no contiene ningún factor de crecimiento añadido y ningún suero añadido que contenga factores de crecimiento.

20 20 La parte inventora ha reconocido que la reacción de células de un tumor epitelial sólido existentes en un líquido corporal de un paciente a una medida terapéutica es adecuada para predecir la respuesta de una enfermedad tumoral originada por este tumor a la medida terapéutica. Esto es sorprendente ya que hasta ahora se ha supuesto que la mayor parte de las células tumorales existentes en el líquido corporal están presentes por tanto en el líquido corporal, ya que éstas han perdido su capacidad de crecer en asociación con otras células del tumor. Se ha supuesto por tanto que éstas no sean representativas de un tumor sólido. La parte inventora ha reconocido sin embargo que pueden modificarse las células tumorales epiteliales existentes en un líquido corporal de modo que puedan asentarse de nuevo y crecer en el agregado celular. Con ello desempeñan un papel decisivo en la formación de metástasis con frecuencia amenazante para la vida.

25 30 En el caso de la enfermedad tumoral puede tratarse también de una enfermedad residual mínima o una reaparición de la enfermedad tumoral en forma de metástasis tras la separación completa de un tumor primario. En el líquido corporal pueden estar presentes células tumorales epiteliales con frecuencia también aún años tras la separación de un tumor primario epitelial sólido. En un caso de este tipo no sería posible en absoluto una extracción de tejido del tumor sólido, tal como se ha descrito en Veneziani *et al.*

35 35 Mediante el procedimiento de acuerdo con la invención es posible, antes del inicio de una terapia sin extracción de una muestra de tejido del tumor sólido de un paciente, comprobar si una medida terapéutica tomada en consideración es adecuada para la terapia de la enfermedad tumoral. Esto permite una terapia individual específica para el paciente por medio de aquella medida terapéutica a la que responde de la mejor manera el respectivo paciente. Al mismo tiempo puede evitarse mediante el procedimiento de acuerdo con la invención que el paciente se trate con una terapia cara ineficaz o de mala eficacia para él y rica en efectos secundarios. Aparte de las ventajas individuales para los pacientes individuales pueden ahorrarse por medio del procedimiento de acuerdo con la invención costes en la atención sanitaria.

40 45 El procedimiento de acuerdo con la invención se arregla sin procedimientos de enriquecimiento específicos para células tumorales epiteliales, por ejemplo por medio de partículas magnéticas revestidas con anticuerpos. Debido a ello está excluida una falsificación de la tasa de mortalidad determinada mediante enriquecimiento distinto o incompleto para distintas células. Además se arregla el procedimiento de acuerdo con la invención sin un aislamiento de las células que modifica posiblemente las propiedades de las células tumorales del tejido tumoral por medio de digestión enzimática y sin un cultivo a lo largo plazo de las células tumorales habitual hasta ahora en caso de ensayo de químiosensibilidad. En el cultivo a largo plazo pueden modificarse las propiedades, tal como por ejemplo la sensibilidad de las células tumorales frente a la medida terapéutica. Mediante el aislamiento de las células y el cultivo a largo plazo puede producirse por ejemplo una falsificación de los resultados. Por medio del procedimiento de acuerdo con la invención puede determinarse por el contrario la sensibilidad del tumor frente a la medida terapéutica de manera específica y selectiva en las células tumorales epiteliales obtenidas del líquido corporal.

50 55 60 El procedimiento de acuerdo con la invención puede realizarse con ello de manera claramente más rápida y conduce más rápidamente a un resultado que el procedimiento conocido por ejemplo por Veneziani *et al.* No es necesario extraer del paciente tejido del tumor epitelial sólido y cultivar las células obtenidas de esto, antes de que se expongan a la medida terapéutica. Después de que las células se hayan expuestos a la medida terapéutica, no es necesario ningún crecimiento de las células, ya que en el procedimiento de acuerdo con la invención no debe determinarse ninguna inhibición del crecimiento para la evaluación de la eficacia de la medida terapéutica.

En el caso del líquido corporal puede tratarse de sangre, líquido ascítico, linfa, exudado pleural, líquido cefalorraquídeo u orina. Las células tumorales epiteliales pueden ser a este respecto células tumorales epiteliales (CETC) circulantes, en particular que aparecen en la sangre.

Antes de la suspensión en el medio de cultivo pueden enriquecerse las células tumorales únicamente con

5 aprovechamiento de su peso específico más alto en comparación con el líquido corporal que las rodea, en particular dejándolas sedimentar o mediante centrifugación. Cuando se trata en el caso del líquido corporal de sangre, pueden lisarse los glóbulos rojos contenidos en el mismo antes del enriquecimiento de las células tumorales. Esto facilita una identificación posterior óptica, en particular de análisis de imagen, de las células tumorales epiteliales.

10 Para la distinción de otras células existentes en el líquido corporal pueden llevarse a contacto las células tumorales epiteliales con una sustancia que marca específicamente las células tumorales, en particular un anticuerpo específico para células epiteliales. En el caso del anticuerpo puede tratarse por ejemplo de un anticuerpo que reconoce el antígeno epitelial humano, por ejemplo el anticuerpo monoclonal HEA-125. El antígeno epitelial humano que se designa como HEA o como CD326, no aparece en células sanguíneas. Dado que las células epiteliales no

15 aparecen habitualmente en el líquido corporal, es suficiente un anticuerpo que marca, en particular que coloreea, específicamente células epiteliales para identificar éstas como células tumorales epiteliales. La sustancia que marca de manera específica las células tumorales es una sustancia que no influye en la viabilidad de las células tumorales epiteliales o al menos no esencialmente.

20 Para la identificación de las células tumorales epiteliales destruidas y muertas o bien de las células tumorales vivas y no destruidas puede añadirse a las células tumorales epiteliales un primer indicador que indica de manera específica células destruidas y/o muertas, en particular yoduro de propidio, o un segundo indicador que indica de manera específica células vivas. Con la adición de yoduro de propidio permanecen no coloreadas las células vivas debido a su membrana celular intacta, mientras que se colorean las células muertas y destruidas por el yoduro de propidio introducido en las células.

25 La medida terapéutica puede comprender una exposición frente a radiación o calor o una puesta en contacto con un agente citoestático, en particular 5-fluorouracilo, u otro agente terapéutico dirigido contra el tumor. En el caso del tumor epitelial sólido puede tratarse de un carcinoma de mama o un carcinoma bronquial.

30 A continuación se explica la invención por medio de un ejemplo de realización y de la figura 1.

35 La figura 1 muestra la tasa de mortalidad de células que llevan el antígeno epitelial humano (HEA), tras incubación con 5-fluorouracilo y coloración con yoduro de propidio dependiendo de la concentración del 5-fluorouracilo usado y del tiempo de incubación.

40 Se mezclan 3 ml de sangre mezclada con EDTA como anticoagulante con 30 ml de reactivo de lisado de cloruro de amonio para células sanguíneas rojas (Qiagen, 40724 Hilden, Alemania) y se incuban durante 10 minutos a de 8 a 12 °C. Los leucocitos y las células tumorales epiteliales se sedimentan mediante centrifugación durante 7 minutos a

45 700 x g. Después de la decantación del sobrenadante que contiene los glóbulos rojos lisados se resuspende el sedimento en 50 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se sedimenta de nuevo durante 7 minutos con 700 x g. Después se suspende el sedimento en 300 µl de medio F12 de Ham sin rojo de fenol con L-glutamina 1 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomicina, 50 pg/ml de gentamicina y 1 pg/ml de fungizona (= anfotericina B), pH 7,4.

50 Para la delimitación de las células tumorales de las células sanguíneas restantes se añaden 30 µl del anticuerpo marcado con fluorocromo diluido previamente ya listo para su uso anti-CD326-FITC (Miltenyi Biotec GmbH, 51429 Bergisch Gladbach, Alemania) a la suspensión celular y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación se añaden 6 ml de medio F12 de Ham con composición descrita anteriormente y se

55 suspenden las células en esto. En las concavidades de una placa de microtitulación se disponen en cada caso 100 µl de PBS para una muestra control o 100 µl de PBS con el agente terapéutico que va a someterse a ensayo 5-fluorouracilo (Medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Theaterstr. 6, 22880 Wedel, Alemania) en concentraciones de 5 ng/ml, 50 ng/ml y 500 ng/ml. Como indicador de células muertas se añaden adicionalmente en cada caso 10 µl de una solución de yoduro de propidio 5 mg/ml. A continuación se añaden en cada caso 100 µl de la suspensión celular.

60 Al inicio de la incubación y tras 1 hora, 3 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas se analiza citométricamente la suspensión celular contenida en cada concavidad. A este respecto se determina en cada caso el número de células tumorales contenidas en total en un determinado volumen y la proporción de las células tumorales destruidas y muertas, es decir coloreadas intracelularmente por yoduro de propidio en las células tumorales contenidas en total. A continuación, de la proporción de las células muertas determinada para cada una de las muestras se resta la proporción de las células determinada para la muestra control y mediante esto se determina la tasa de mortalidad de las células tumorales debido al agente terapéutico dependiente del tiempo y de la concentración.

65 La figura 1 muestra desarrollos de curvas típicos para distintas concentraciones del agente citoestático 5-fluorouracilo tras distintos tiempos de incubación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la predicción de la respuesta de una enfermedad tumoral originada por un tumor epitelial sólido de un paciente a una medida terapéutica, en el que se suspenden células tumorales epiteliales de un líquido corporal del paciente en cada caso en un medio de cultivo celular, en el que las células tumorales de una muestra del medio de cultivo celular que contiene las células tumorales se exponen a la medida terapéutica, mientras que las células tumorales de una muestra control del medio de cultivo celular que contiene las células tumorales permanecen no tratadas, en el que a continuación para la muestra y la muestra control en cada caso se determina la proporción de células tumorales epiteliales destruidas y muertas en el número total de células tumorales epiteliales y a partir de esto una tasa de mortalidad condicionada por la medida terapéutica de las células tumorales epiteliales como medida de la respuesta, en el que el medio de cultivo celular no contiene ningún factor de crecimiento añadido y ningún suero añadido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que entre la medida terapéutica y la determinación de la proporción de células tumorales epiteliales destruidas y muertas en el número total de las células tumorales epiteliales se encuentra un tiempo de 1 hora hasta 3 días, en particular de 2 horas hasta un día.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que las células tumorales se mantienen en el tiempo en condiciones de cultivo celular, que permiten sin medida terapéutica una supervivencia de las células tumorales en el medio de cultivo celular.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el líquido corporal es sangre, líquido ascítico, linfa, exudado pleural, líquido cefalorraquídeo u orina.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que las células tumorales epiteliales son células tumorales epiteliales circulantes (CETC).
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que las células tumorales se enriquecen antes de la suspensión en el medio de cultivo aprovechando su peso específico más alto en comparación con el líquido corporal que las rodea, en particular dejándolas sedimentarse o mediante centrifugación.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el líquido corporal es sangre y los glóbulos rojos contenidos en el mismo se lisan antes del enriquecimiento de las células tumorales.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que las células tumorales epiteliales para la diferenciación de otras células existentes en el líquido corporal se llevan a contacto con una sustancia que marca de manera específica las células tumorales, en particular un anticuerpo específico para células epiteliales.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que a las células tumorales epiteliales se añade un primer indicador que indica de manera específica células destruidas y/o muertas, en particular yoduro de propidio, o un segundo indicador que indica de manera específica células vivas.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la medida terapéutica comprende una exposición frente a radiación o calor o una puesta en contacto con un agente citoestático, en particular 5-fluorouracilo, u otro agente terapéutico dirigido contra el tumor.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el tumor es un carcinoma de mama o un carcinoma bronquial.

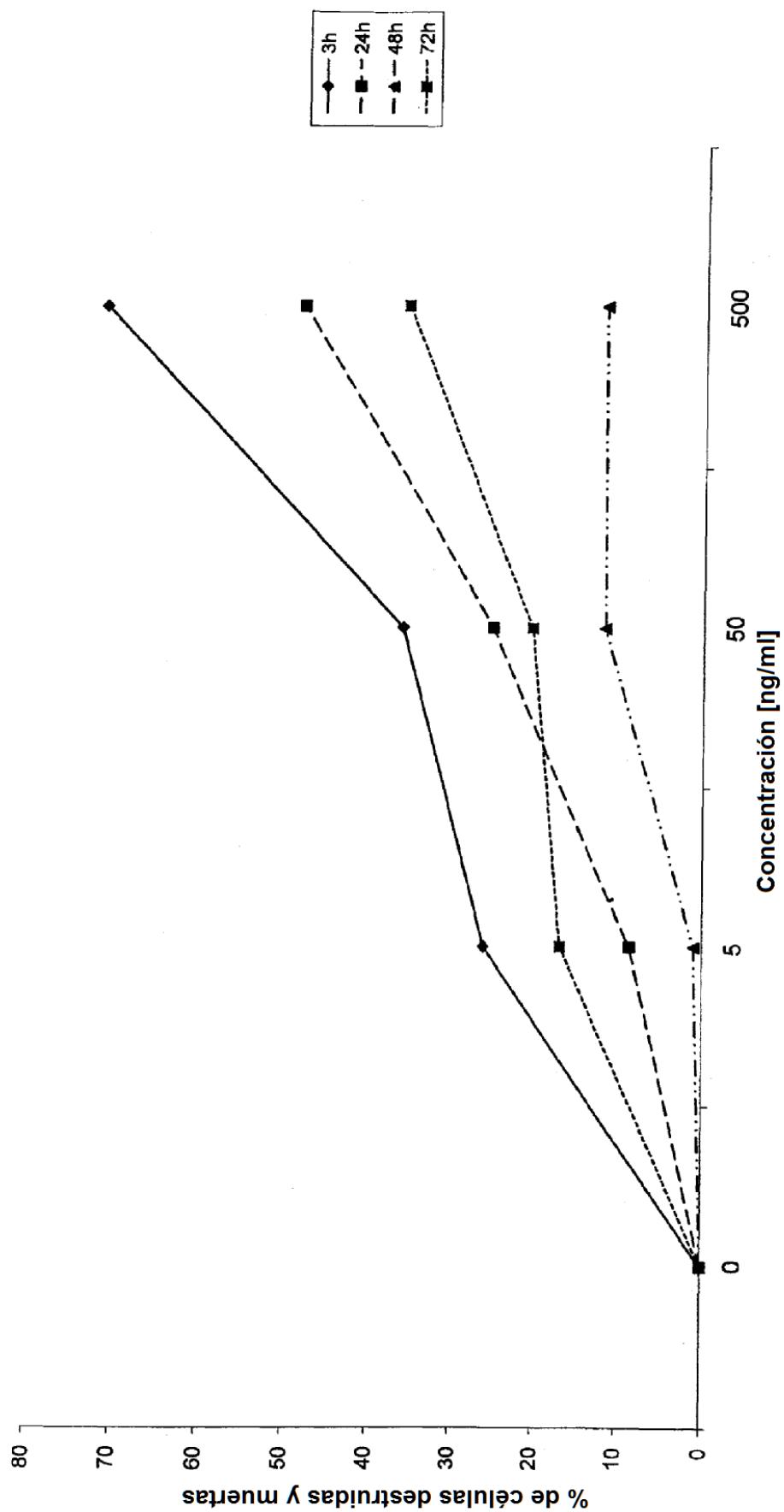


Fig. 1